

# 牡牛精液ヒアルロニダーゼの実験的不活性化 及びその阻止

和田 宏

Experimental inactivation of bull semen hyaluronidase and  
preservation of its activity.

Hiroshi WADA

(1) Studies on the experimental inactivation of the hyaluronidase and preservation of its activity were made with the bull semen. The enzyme activity was determined by viscosimetry after McClean's technique.

(2) The semen hyaluronidase diluted with distilled water was inactivated in a short time by stirring, aeration and grinding, but only slowly by shaking. This inactivation seems to be due to oxydation of oxydazible atom groups in the active hyaluronidase.

(3) However, by using of the yolk "Glucocitrat" as diluent of semen, the hyaluronidase was not affected even by the treatments mentioned above. It was found that the protective effect on the enzyme activity in this case was due to the yolk added to the diluent.

(4) Gelatine hydrosol, vaginal mucus of estrous cow and starch hydrosol protected the enzyme from inactivation. It was considered that these substances acted as protective colloids and prevented the enzyme from oxydation.

(5) The hyaluronidase was inactivated by hydrogen peroxide. In spite of its being an antioxydant, hydroquinone had no protective effect on the enzyme against the inactivation due to stirring.

McClean & Rowlands (1942) は Hyaluronidase〔以下 H-ase とする〕が哺乳動物の精子に含まれていることを実証した。之が排卵された卵子を圍繞する卵丘細胞を粘着しているところの Hyaluronic acid〔以下 H-acid とする〕を主成分とする粘稠物質を分解して放線冠細胞を離散せしめ、精子と卵子の邂逅を可能ならしむるものと解釈されている。また山根<sup>9)</sup> (1951, 52) は卵子の第2極小体放出従つて受精完了にも関連あることを暗示している。併し乍ら H-ase の有する組織内拡散作用と H-acid 分解力は必ずしも一致せず H-ase そのものにも新しい検討が加えられている。此の酵素の物理化学性に関しては多くの研究があり、その作用は特異的及び非特異的 H-ase inhibitor に左右せられるし、また蛋白質に非常によく似た性質を有する酵素であり易熱性物質であつて破壊され易く、溶液の振盪やオゾンを通ずることにより破壊されることが知られている。

筆者は牛の人工授精に於ける受胎率向上に対する H-ase の応用価値を検討していたが、精液に対する処理により酵素作用が著しく不活性化されることを知つたので、これに関しまつたその防止に関する実験も行つた。それらの実験結果をここに報告する。

## 実験材料並に方法

本実験に用いた精液は岡山県岡山種畜場繁殖の和牛並にホルスタイン種牡牛より擬牝台、人工

腔法により、例外を除き略6日間隔で採取した正常精液で精子活力は何れも $\geq 85$ 以上のものであつた。酵素作用は Viscometry により McClean<sup>2)</sup>の方法を多少変更した方法<sup>3)</sup>によつた。基質としては人臍帯より抽出したヒyaluron酸加里 (Potassium hyaluronate) の0.1%水溶液を用い、此の液4容に対し pH 4.6 の 1M Citrate buffer 1容と被検液1容を混合した。而して此の混合液を Ostwald 粘度計に入れ、34°C の恒温水槽中でその粘度の低減を測つた。そして粘度半減値 (half-viscosity level) に対する反応時間が20分のものを1粘度低減単位 (v. r. u.) として酵素量を算出した。

今まで本酵素測定にはストップウォッチ2個を交互に動かしていたが筆者は1個を連続的に動かして反応時間測定用とし、他の1個を2, 3分毎に動かして粘度計内混合液の流出時間測定用とした。粘度半減値を  $h$  としこの両側の測定の反応時間を  $A, B$  とし、その時の粘度計の流出時間を夫々  $a, b$  とするときには比例配分により  $(B + \frac{b}{2}) - (A + \frac{a}{2}) : a - b = x : a - h$  従つて粘度半減値に達する反応時間は  $(A + \frac{a}{2}) + \frac{\{(B + \frac{b}{2}) - (A + \frac{a}{2})\} \times (a - h)}{a - b}$  より求めた。

次に稀釈精液に加えた処理の中、物理的のものは次の4種類であつた。

(1) 攪拌 日本精機工業のホモゲナイザー HA II 型を用いた。これはミキサー式のもので金属の羽根を急速に回転して均質化するものであるが実質的には試料は烈しく攪拌される。

(2) 通気 径 3 cm のガラス試験管に試料約 30 cc. を入れ管底まで入れたピペットの尖端から気泡が相連続する程度に空気を吹き込んだ。

(3) 振盪 径 3 cm のガラス試験管に試料を約 30 cc. 入れ振盪方向に略 45° の角度に立てかけて振盪機に装着し、1分間75往復、振幅 9 cm の水平運動で1~2時間振盪した。

(4) 磨砕 径が略 9 cm の磁製乳鉢を用い試料約 10 cc. を入れ少量の石英砂と共に普通の速度 (1分間 200~250回位) で乳鉢を廻して5分間磨砕した。

また精液の稀釈液としては蒸溜水、卵黄 “グルコチトラート” (卵黄 1 : グルコチトラート 6) 等を主として用いたが卵黄は常に新鮮なものを用いた。特別の目的の為に次の様なものを稀釈剤として用いた。

“グルコチトラート”\*

卵黄乳濁液 (卵黄 1 : 蒸溜水 6)

ゼラチン液 (1% ヒドロゾル)

葡萄糖水溶液 (5%, 50%)

澱粉糊液 (0.5%, 1%)

発情牛膣粘液 (蒸溜水稀釈15倍, 30倍)

ハイドロキノン (5%, 0.2%)

過酸化水素水 ( $H_2O_2$  32%)

精液等の試料は H-ase の単位測定により自ら測定に適する濃度が決まる訳であるが比較的軽度の不活性化でも粘度計にかゝらなくなるので不活性化効果を確実に断定することが出来ない。斯かる理由から試料は相当に濃度の高いものにした。即ち本実験に於ては H-ase 単位測定濃度は多くの場合100倍前後であつたが不活性化効果を判定する為に70~80倍位に稀釈した。

\* 三興化学製、クエン酸ソーダ 2.35%, 無水葡萄糖 3% 含有

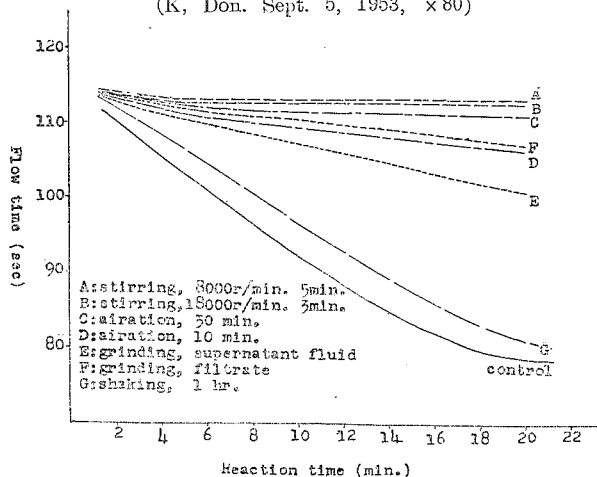
## 実験成績並に考察

Table 1. Effect of stirring on semen hyaluronidase diluted with distilled water.

Name of bull		Chine (千音)	K. Gemima	K, Gemima	K. Don	K. Don	K. Don		
Date on which semen collected		24 Aug., 53	3 Sept., 53	3 Sept., 53	5 Sept., 53	9 Sept., 53	4 Dec., 53		
No. of Sperms (10millions/cc)		—	101	101	154	113	120		
H-ase unit (v. r. u/cc)		—	155000	155000	130000	120000	111750		
Rate of dilution		50	80	80	80	80	80		
Frow time (sec.)	Solvent	67	67	67	67	67	54		
	Heated semen + buffered substrate	118.8	110.4	110.4	114.2	117.6	98.8		
	Half viscosity level	92.9	88.4	88.4	90.6	92.3	76.4		
Reaction time to half-viscosity level.	Stirring.	Control (unaterated)		412 (72)*	760 (80)	364 (68)	679 (71)	883 (85)	720 (87)
		3000r/min., 2 min.		743 (79)	538 (75)	∞ (112)			
		3000r/min., 3 min.		1111 (85)	502 (75)				
		3000r/min., 5 min.	8 (115)	1175 (87)					
		3000r/min., 20 min.	8 (117)						
		8000r/min., 3 min.				∞ (107)	1509 (82)		
		8000r/min., 5 min.				∞ (113)	∞ (110)	∞ (87)	
		18000r/m., 3 min.						1482 (81)	
		18000r/m., 5 min.						∞ (88)	

\* Flow time of mixture at a reaction time of 20 minutes are given in ( ) in this and the following tables.

Fig. 1. Effect of various treatments on semen hyaluronidase diluted with distilled water.  
(K. Don. Sept. 5, 1953, ×80)



## I 精液 H-ase の不活性化

## に関する実験

(1) 攪拌の効果 蒸溜水稀釈精液を攪拌した成績は第1表の如くである。毎分3000回転、2分間の処理でも不活性化効果の現われたものもある。併し乍ら之は酵素濃度にも関係すること時間で廻転数だけで比較することは出来ないが回転数と処理時間の増加と共に酵素作用は漸次衰弱している。此の場合に於ても処理時間の長

さが、かなり重要な要素であることは一般の酵素等の反応と同様であることがわかる。

これらの中の1例を図示すれば第1図の反応曲線A, Bの如くなり不活性化効果が明らかである(曲線が水平に近くなる程、反応が弱く粘度計内の混合液の流下時間が長くなる。従つて一定の粘度に達する反応時間は延長することを示している)。

(2) 通気の効果 蒸溜水で稀釈した精液に於ける通気による不活性化効果は第2表に掲げた。10分間の通気により粘度半減値に達する反応時間は対照に比し2,3倍から∞まで

延びており、30分処理では何れも $\infty$ になっている。オゾンを通ずることにより H-ase の破壊せられる<sup>1)</sup>ことは知られているが空気も大きな影響を与えることがわかった。これらの実験例の中の1試料の反応曲線を図示すれば第1図のD及びC曲線の如くなるが夫々10分及び30分の通気による酵素作用の

Table 2. Effect of airtion, grinding and shaking on semen hyaluronidase diluted with distilled water.

Name of bull		K. Gemima	C. Imperial	K. Don	K. Gemima	K. Don	K. Don	
Date on which semen collected		3 Sept., 53	27 Aug., 53	1 Sept., 53	4 Sept., 53	5 Sept., 53	9 Sept., 53	
No. of sperms. (10 millions/cc)		101	123	117	101	154	113	
H-ase unit (v. r. u. /cc.)		155500	196500	101250	155500	130750	120750	
Rate of dilution		80	100	50	80	80	80	
Flow time (sec.)	Solvent	67	67	67	67	67	67	
	Heated semen + buffered substrate	110.4	122.1	117.7	110.4	114.3	117.6	
	Half viscosity level	88.7	94	92.4	88.7	90.6	92.3	
Reaction time to h. v. l. (sec.)	Control (untreated)		760 (79)	612 (75)	382 (71)	363 (74)	679 (71)	883 (85)
	Airation	10 min.		1028 (88)	1160 (89)		$\infty$ (105)	$\infty$ (106)
		30 min.		$\infty$ (117)	$\infty$ (110)		$\infty$ (110)	$\infty$ (111)
	Shaking	1 hr.		1282 (95)			858 (81)	1055 (88)
		2 hrs.		1466 (96)				
	Grinding	Filtrate	$\infty$ (110)	2200 (110)		1215 (88)	$\infty$ (106)	$\infty$ (111)
		Supernatant fluid	$\infty$ (101)			1018 (84)	$\infty$ (99)	

ば濾液の方の H-ase 作用が弱いが之は精子又はその一部が濾紙又は微粉になった石英砂の為に濾出せず濾液中の酵素の減少によるものと思われる。

之等の実験例の中の1試料の反応曲線を図示すれば第1図の如くなり僅か5分間の磨砕によりても酵素作用が大きく破壊されることを知った。図中の曲線E及びFは夫々磨砕静置後の上清及び濾液についての反応曲線を示しているが何れも非処理の対照に比すれば著るしく酵素作用が侵されている。

(4) 振盪の効果 蒸溜水稀釈精液の酵素作用に対する振盪の影

による酵素作用の変化を示している。此の結果に於いても30分通気の場合は H-ase 作用は殆んど認められない。

(3) 磨砕の効果 蒸溜水稀釈精液の磨砕による酵素作用の変化は第2表に示した。磁製乳鉢内に於ける普通の磨砕によりて反応時間が著るしく長引くことが判った。磨砕精液の静置後の上清と濾液について比較すれ

Fig. 2. Effect of stirring on semen hyaluronidase activity diluted with yolk "Gluco-citrat".

(K. Gemima, Sept. 15, 1953,  $\times 80$ )

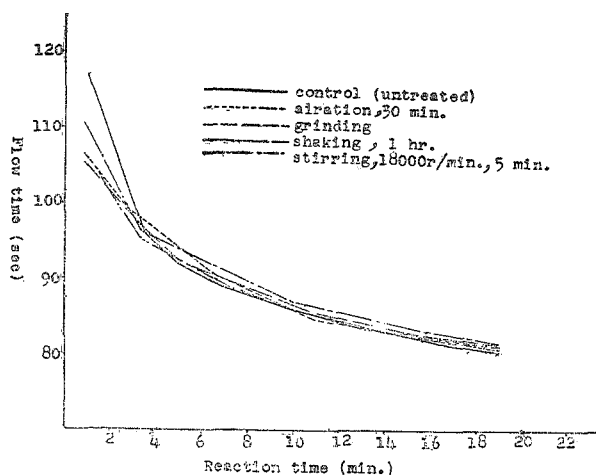
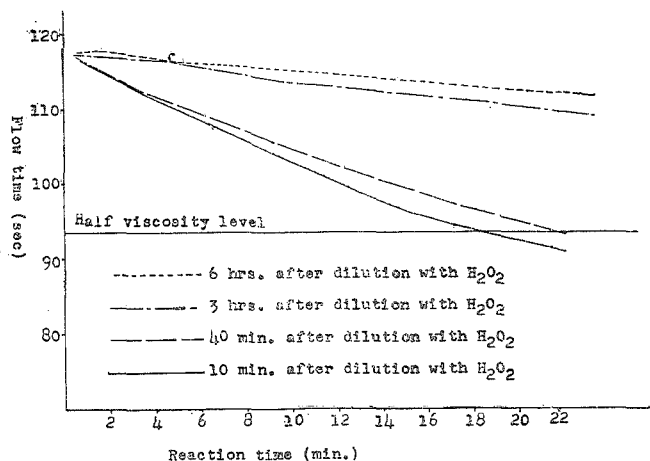


Fig. 3. Effect of  $H_2O_2$  on semen hyaluronidase activity.

(K. Gemima, Oct. 23, 1953,  $\times 80$ )



液を稀釈し、静置した場合の成績は第6表に掲げ第3図に示した。此の場合、酵素作用は時間の経過と共に破壊されるがこれは発生機の酸素によるものと思はれる。

## II 精液 H-ase の不活性化阻止に関する実験

(1) 卵黄グルコチトラートの効果 蒸溜水稀釈の場合と同一倍率になる様に夫々の精液試料を卵黄グルコチトラートで稀釈し、これを攪拌、通気、磨砕及び振盪した場合の酵素作用に及ぼす影響は第3表の如くである。これによつてみると卵黄グルコチトラートで稀釈した場合、攪拌、通気、磨砕、振盪により H-ase は殆んど破壊されない。卵黄等を加えた場合当然溶媒の粘度は高くなるが、本実験の条件下で卵黄乳濁液を用いた場合を蒸溜水の場合と比較して、その粘度半減値は前者が1秒余り高い程度であつたから表中には蒸溜水の場合の半減値を適用した。粘性は卵黄グルコチトラ

響は第2表に掲げた。

これによつてみると前記の3処理ほど不活性化効果は大ではないが明らかに酵素作用が鈍化することがうかがはれる。例数の少ない憾はあるが勿論時間の長い方が、即ち1時間振盪より2時間振盪の方が不活性化作用が大い。

いま、これらの中の一試料の反応曲線は第1図に示されている。曲線Gは同一精液の1時間振盪の場合の反応曲線である。

(5) 過酸化水素水の効果 32%の過酸化水素水をもつて精

Table 3. Protective effect of yolk "Gluco-citrat" on semen hyaluronidase from inactivation caused by various treatments.

Name of bull		K. Gemima	K. Gemima	K. Don	K. Don	
Date on which semen collected		11 Sept., 53	15 Sept., 53	19 Oct., 53	1 Sept., 53	
No. of sperms (10 millions/cc.)		183	106	69	117	
H-ase unit (v. r. u. /cc)		114250	94750	92250	101250	
Rate of dilution		80	80	70	50	
Flow time (sec.)	Solvent	67	67	67	67	
	Heated semen + buffered substrate	117.6	122.5	115.4	117.7	
	Half viscosity level	92.3	94.7	91.2	92.4	
Reaction time to half viscosity level (sec.)	Control (untreated)		388 (81)	308 (80)	421 (81)	216
	Stirring	8000r/min., 3 min.	(79)			
		8000r/min., 5 min.	(81)			
		18000r/min., 5 min.		330 (81)	245 (85)	
		18000r/min., 10 min.			1341 (93)	
	Airation	10 Min.	306 (83)	341 (81)	424 (85)	247
		30 min.		338	426 (85)	206
	Shaking	1 hr.			336 (84)	
		2 hrs.			459 (85)	
	Grinding		156 (81)		106 (80)	

Table 4. Effect of stirring on the activities of semen hyaluronidase in solutions of glucose, "Gluco-citrat", and yolk.

Diluent	Yolk × 7	"Gluco- citrat" *	Yolk × 7	"Gluco- citrat" *	Glucose 5%	Glucose 5%
Name of bull	K. Gemima	K. Gemima	K. Gemima	K. Gemima	K. Don	K. Don
Date on which semen collected	21 Oct., 53	21 Oct., 53	23 Oct., 53	23 Oct., 53	4 Dec., 53	4 Dec., 53
No. of sperms (10 millions/cc)	69	69	152	152	120	120
H-ase unit (v. r. u. /cc)	92250	92250	—	—	111750	111750
Rate of dilution	80	80	80	80	80	80
Flow time (sec.)	Solvent	67	67	67	55	61
	Heated semen + buffered substrate	115.4	115.4	123.6	102	113
	Half viscosity level	91.2	91.2	95.3	78.5	87
Reaction time to h. v. l. (sec.)	Control (untreated)		1066 (87)	857 (87)	849 (77)	1033 (82)
	Stirring	18000r/min., 5 min.	∞ (100)	∞ (108)	∞ (95)	∞ (110)
		18000r/min., 10 min.	∞ (108)	∞ (113)		

\* "Gluco citrat" is a preparation of Sanko Kagaku Co. Ltd., and it contains glucose 3% and sodium citrate 2.35%.

らは第2図の如く、処理を施さなかつた対照の曲線と各処理区の曲線が一致して各々の間に差がない。

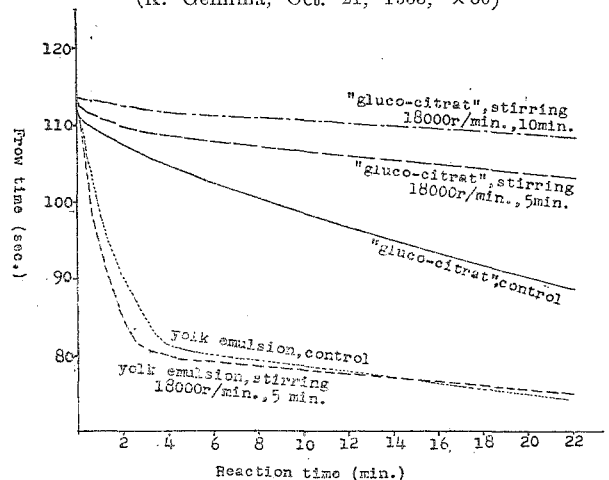
卵黄乳濁液（卵黄1：蒸溜水6）及びグルコチトラートで夫々別々に同一倍率に精液を稀釈し攪拌した結果を第4表に示した。またそれを図示すれば第4図の様になる。これによつてみればグルコチトラートのみでは酵素作用は侵されるが卵黄乳濁液では侵されていない。また葡萄糖水溶液で精液を稀釈し攪拌した結果は第4表及び第5図に示されている。これによると葡萄糖水溶液は10%及び50%に於いてさえも H-ase 不活性化を阻止する効果はない。以上のことから卵黄グルコチトラートの H-ase の活性維持の効果は卵黄に負うものであることが判つた。

アスコルビン酸が Antioxydant として H-ase の安定に有効であることは実証されている。一方卵黄、卵白等の中にはビタミンCはなく、孵化につれてそれらの中にビタミンCが生ずることが SURENDA NATH RAY(1943) 以来認められている事実<sup>4), 5)</sup>である。従つて新鮮卵黄中にはビ

ートの方が高いにもかかわらず反応初期に於ける粘度の減少は蒸溜水の場合より速い傾向さえある。卵黄グルコチトラートは精液 H-ase の不活性化を阻止するのみならず酵素作用を助長する原因（卵黄粒以外の部に酵素が溶けることも考えて）存在の可能性すらも考えられないことはない。これ

Fig. 4. Protective effect of yolk against inactivation of semen hyaluronidase caused by stirring.

(K. Gemima, Oct. 21, 1953, × 80)



タミンCはないことになり、卵黄の H-ase に対する保護的作用は此のビタミンC以外の原因に基くものである。

(2) ゼラチン液の効果 ゼラチンの1%ヒドロゾルを用い精液を稀釈し攪拌したが酵素の不活性化は大いに阻止されたものと考えられる、それらの成績は第5表及び第6図に示した。

(3) 腔粘液の効果 発情したホルスタイン種牝牛の腔粘液を腔鏡を用いて清潔に採取したが何れの粘液も発情最盛期のものであつた。これらの粘液を蒸溜水で何れも15倍及び30倍に稀釈し、それでもつて精液を稀釈して攪拌した。

30倍稀釈粘液の場合は稀薄に過ぎ効果が殆んどなかつたが、(表には15倍の場合のみ示した) 15倍稀釈粘液では H-ase 保護の効果がみられた。而してこれより濃厚なものは、さらに効果が

Table 5. Effect of stirring on the activities of semen hyaluronidase in gelatin hydrosol, vaginal mucus and starch hydrosol.

Diluent		Vaginal mucus × 15	Vaginal mucus × 15	Starch hydrosol 0.5%	Starch hydrosol 1%	Gelatine 1%	Gelatine 1%	
Name of bull (or cow)		(A)	(B)	K. Don	K. Don	K. Don	K. Don	
Date on which semen collected		11 Dec., 53	11 Dec., 53	10 Dec., 53	10 Dec., 53	4 Dec., 53	18 Dec., 53	
No. of Sperms (10 millions/cc)				111	111	120	129	
H-ase unit (v. r. u./cc)				80750	80750	111750	107000	
Rate of dilution		70	70	70	70	80	70	
Flow time (sec.)	Solvent	54	54	54	54	59	59	
	Heated semen + buffered substrate	104.4	104.2	111	111	106	103	
	Half-viscosity level	79.2	79.2	82.2	82.2	82.5	81	
Reaction time to h. v. l. (sec.)	Control (untreated)		532 (59)	425 (58)	1227 (81)	726 (71)	653 (67)	597 (65)
	Stirring	18000r/min., 5 min.	707 (66)	437 (59)	∞ (101)	1270 (83)	800 (70)	601 (65)
		18000r/min., 10 min.			∞ (103)	1527.9 (93)	534 (65)	626 (65)

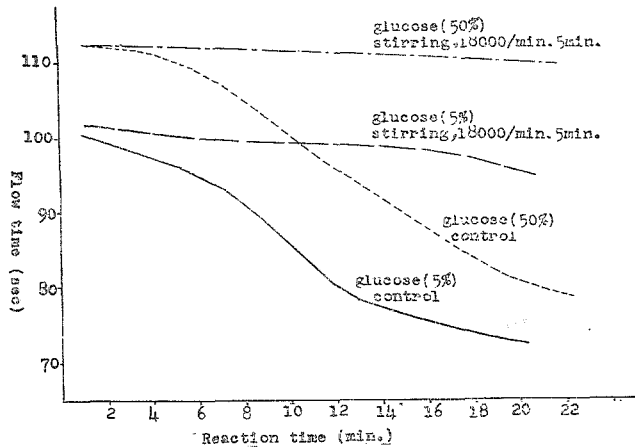
酵素作用が保護された。

これらの結果は第5表及び第8図に示した。これによると0.5%液では10分間の攪拌によりて殆んど完全に不活性化されるが、然しながら1%液では相当程度の保護効果が現われている。

(5) ハイドロキノン水溶液の効果 ハイドロキノンが Antioxydant として H-ase の安定に

Fig. 5. Inactivation of semen hyaluronidase diluted with glucose solution by stirring.

(K. Don, Dec. 4, 1953, ×80)



あるものと思はれる。これらの結果は第6表及び第7図に示した。

(4) 澱粉糊液の効果 澱粉糊液は0.5%及び1%に調整後、本実験の攪拌に用いたホモゲナイザーで均質化し稍透明度を増したものをを用いた。此の液で稀釈した精液 H-ase は攪拌に対し種々の程度に

Fig. 6. Protective effect of gelatin hydrosol (1%) against inactivation of semen hyaluronidase caused by stirring.

(K. Don, Dec. 4, 1953,  $\times 80$ )

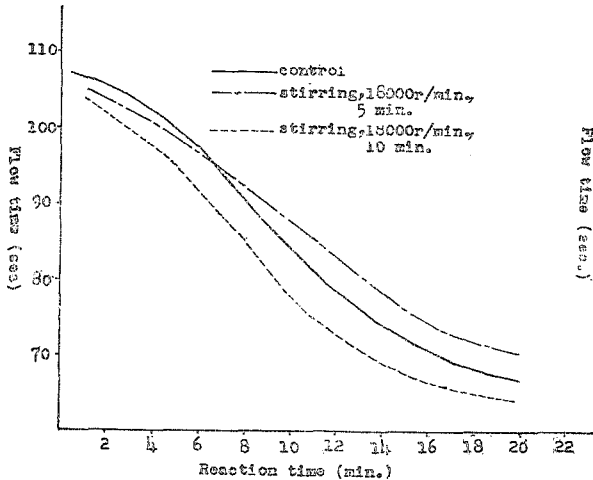
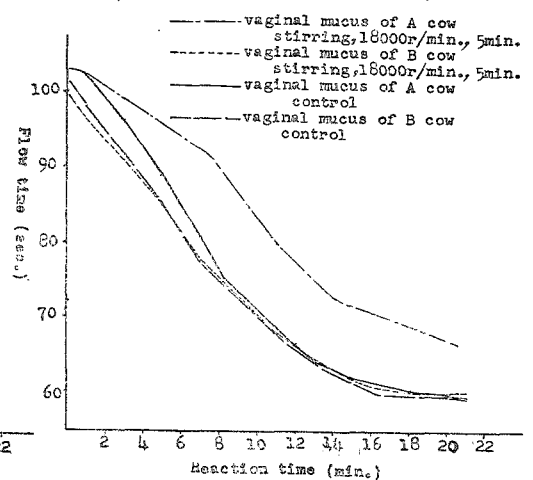


Fig. 7. Protective effect of vaginal mucus against inactivation of semen hyaluronidase caused by stirring.

(K. Don, Dec. 10, 1953,  $\times 70$ )



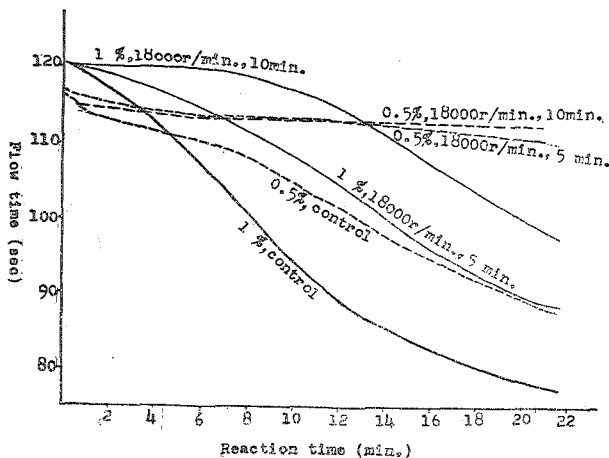
役立つことは知られている。併し乍ら 5%水溶液で精液を稀釈し、これを攪拌した場合の成績は第6表の如くなつた。従つて少くとも本実験の条件下ではヒドロキノンに精液 H-ase 不活性化阻止の効果はないものと認められる。

さて、H-ase 活性基中には酸化され易い原子団の存在することが推察されている。

第1図をみれば明らかであるが、前述の実験条件下で、蒸留水稀釈精液の H-ase に対する不

Fig. 8. Protective effect of starch paste against inactivation of semen hyaluronidase caused by stirring.

(K. Don, Dec. 10, 1953,  $\times 70$ )



活性効果は攪拌の場合が最も大きい。此の攪拌に於ては多量の気泡が混入するが、その他の磨砕、通気、振盪等すべて精液中の酵素と空氣の接触を助け、前記原子団の酸化を促し不活性化を起すものと思はれる。

また、ゼラチンや発情粘液等のヒドロゾル及び卵黄や澱粉糊液等は保護膠質となり H-ase 活性基中の易酸化原子団を物理的に被覆保護して空氣との接触を妨げ酵素の活性を維持するものと思われる。

精液中の遊離した H-ase は速みやかに不活性化されるものと認められている。Bergental et. (1948)<sup>2)</sup>

はヒトの無処置精液の精漿中の H-

ase 量は略2時間で最高値に達すると報告しており、高嶺 (1952)<sup>7)</sup> は卵黄クエン酸ソーダ緩衝液 (3%クエン酸ソーダ7分、新鮮卵黄3分) で 4~7°C に保存した牛の精液の酵素量は6日で最高に



Table 6. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroquinon on semen hyaluronidase activity.

Diluent		Hydroquinon 0.5%	Hydroquinon 5%	Hydroquinon 5%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 32%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 32%
Name of bull		C. Imperial	K. Don	K. Don	K. Gemima	K. Don
Date on which semen Collected		27 Aug., 53	10 Dec., 53	18 Dec., 53	23 Oct., 53	10 Dec., 53
No. of Sperms (10 millions/cc)		123	111	129	152	111
H-ase unit (v. r. u. / cc)		196500	80750	10700	—	80750
Rate of dilution		70	70	100	80	70
Flow time	Solvent	67	54	55	67	54
	Heated semen + buffered substrate	121	108	99	117.4	104.4
	Half viscosity level	94	81	77	92.2	79.2
	Control (untreated)	612 (75)	924 (70)	1120 (73)		
Reaction time to half viscosity level (sec.)	Shaking	1303 (95)				
	Stirring	18000r/min., 10 min.	∞ (106)	∞ (98)		
	Standing	10 min.			1373 (94)	1135 (77.6)
		40 min.			1426 (95)	2069 (86.4)
		3 hrs.			∞ (110)	∞ (99)
		6 hrs.			∞ (112)	∞ (100)

Table 7. Inactivation of solution of hyaluronidase prepatation "sprase"\* by stirring, grinding and airtation.

Date of test		21 Aug., 53	22 Aug., 53	7 Sept., 53	
H-ase unit (v. r. u. / cc. )		375000	345000	375000	
Flow time (sec. )	Solvent	67	67	67	
	Heated enzyme+ buffered sudstrate	118.6	118.6	114.3	
	Half viscosity level	92.8	92.8	90.6	
Reaction time to half viscosity level (sec. )	Control (untreated)		829 (83)	1326 (94)	463 (74)
	Stirring	8000r/min., 5 min.			1163 (89)
		18000r/min., 7 min.	$\infty$ (109)	$\infty$ (112)	
		18000r/min., 9 min.	$\infty$ (113)		
	Grinding				$\infty$ (98.2)
	Airation	10 min.			1290 (91)
		30 min.			$\infty$ (96)

\* Sprase is the hyaluronidase preparation of Mochida Seiyaku Co., Ltd.

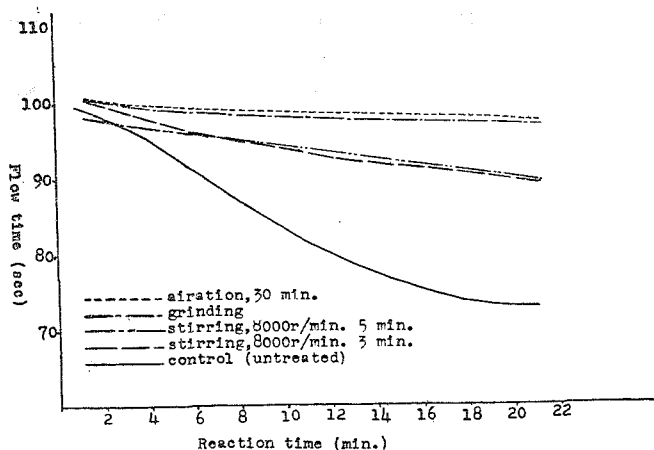
達すると報じている。後者の場合卵黄の存在のために遊離した H-ase の不活性化が遅れ、酵素実在量が上記の日数で最高になったものと思われる。

筆者の小実験に於いてもラットの睪丸は均質化の為のホモゲナイザーによる攪拌に対し相当安定（稀釈度によりては必ずしも安定でない）であるが、これも組織液膠質が少くともその一因であろう。また睪丸性 H-ase 製剤として "sprase" を用い、蒸溜水稀釈の場合の攪拌による不活性効果を試験し第7表及び第9図の如き成績を得た。従つてこれまで述べた種々の効果は精液 H-ase のみに特有のものではない

と思われる。

本実験に於ては H-acid 分解力のみで組織拡散力は検討しなかつた。以上要するに、授精上に於ける応用価値は一応論外としても、精液の取扱ひに於いて空気との接触をさけ、またゼラチンや卵黄を添加して稀釈貯蔵することは H-ase 保存の点からしても有意義なことであり、また H-ase の測定にあたり蒸溜水で稀釈したものゝ均質化等により本酵素が著るしく不活性化されることが判つた。

Fig. 9. Effect of stirring, aeration and grinding on activity of the hyaluronidase preparation "sprase" \*.



\* Sprase is the hyaluronidase preparation of Mochida Seiyaku Co. Ltd.

## 摘 要

(1) 牡牛精液の H-ase 不活性化並にその阻止に対する実験を行い、酵素作用は粘度法によって測つた。

(2) 蒸留水で稀釈した場合、攪拌、通気、磨砕により精液中の H-ase は極く短時間に不活性化される。また振盪によりても緩徐ながら不活性化される。これは H-ase 活性基中の易酸化原子団の酸化によるものであろう。

(3) 卵黄“グルコチトラート”で稀釈して場合は上記処理により不活性化しない。これは卵黄の効果によるものである。

(4) ゼラチンヒドロゾル1%、発情牛腔粘液、澱粉糊液(1%)も H-ase の活性保護の効果がある。卵黄やこれらの物質は保護膠質となり、酵素の酸化を防ぐものと思はれる。

(5) 過酸化水素水(32%)の酵素破壊作用は大であるが、ハイドロキノン水溶液(5%)は攪拌に対し H-ase 安定剤としての効果は認められなかつた。

ヒアルロン酸精製の御好意を賜つた東大医学部薬学科相沢登氏、精液を供与された岡山県岡山種畜場辛島場長並に技官岡秀氏さらに当教室の湯原正隆、田辺昭両君の御助力に深謝する。

## 文 献

- 1) 秋谷七郎、相沢登(1952); Hyaluronidase に就て。スプラッセ文献集、第I輯、PP. 1~9.
- 2) Bergenstal, M., William, D. and Scott, W. (1948); Studies on hyaluronidase. J. Amer. Med. A., 137 (17), PP. 1507~1511.
- 3) McClean, D., Hale, C.W. (1941); Studies on Diffusing Factors the Hyaluronidase activity of Testicular Extracts, Bacterial Culture Filtrats and other agents that increase tissue permeability. Biochem. J. 35 (1,2), PP. 159~183.
- 4) 永山武美(1950); ビタミンC研究の趨勢。化学の領域, 4 (10), PP. 9~17.

- 5) 萩野周三 (1951) ; 孵化鶏卵のビタミンC代謝. 科学, 21 (11), P. 592.
- 6) Sherber, D.A., Bernberg, C.H. & Kurzrok (1948) ; Viscosimetric Determination of the Hyaluronidase content of Spermatozoa. Endocrinology, 42 (1), PP. 20~25.
- 7) 高嶺浩 (1952) ; ウシの精液保存に伴う Hyaluronidase の消長に就いて . 医学と生物学, 25 (2), PP. 86~89.
- 8) 山根甚信 (1952) ; 繁殖生理学領域に於ける Hyaluronidase の意義. スプレーゼ文獻集, 第Ⅱ輯, PP. 60~69.